

Ueber das Vorkommen
eines peptonisierenden Enzyms (Peptase) im Malz
und
Versuche zur Trennung der stickstoffhaltigen
Bestandteile in Malz, Würze und Bier.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
hohen philosophischen Fakultät
(Sektion II)
der
Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Bolesław de Verbno Laszczyński
aus Sulisławice.

Eingereicht am 6. Juli 1898.
Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1898.

München.
Druck von R. Oldenbourg.
1899.

Ueber das Vorkommen
eines peptonisierenden Enzyms (Peptase) im Malz
und
Versuche zur Trennung der stickstoffhaltigen
Bestandteile in Malz, Würze und Bier.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
hohen philosophischen Fakultät
(Sektion II)
der
Kgl. bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Bolesław de Verbno Laszczyński
aus Sulisławice.

Eingereicht am 6. Juli 1898.

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 1898.



München.

Druck von R. Oldenbourg.
1899.

Dem Andenken des Vaters gewidmet.

Vorliegende Arbeit wurde im gärungs-chemischen
Laboratorium der k. bayer. technischen Hochschule zu
München auf Anregung und unter liebenswürdigster Leitung
des Herrn Professor Dr. Karl Lintner ausgeführt. Für die
vielen mir dabei erteilten Ratschläge sage ich ihm meinen
herzlichsten Dank.

Einleitung.

Die stickstoffhaltigen Bestandteile der Gerste bestehen fast ausschließlich aus Proteinstoffen.

Bei der Keimung erleiden dieselben weitgehende Veränderungen: es entstehen lösliche Proteinstoffe aus unlöslichen, auch werden hierbei Proteinstoffe gespalten in einfachere, organische, stickstoffhaltige Körper, die man gemeinhin als Amide zu bezeichnen pflegt.

Die stickstoffhaltigen Substanzen des Malzes haben seit geraumer Zeit das Interesse der Wissenschaft und Technik in Anspruch genommen. Zahlreiche Methoden sind zur Charakterisierung und Bestimmung derselben angewendet worden.

Man unterscheidet gewöhnlich im Malze sowie auch im Bier und in der Würze folgende drei Gruppen dieser Stoffe: Eiweißkörper, Albumosen (bzw. Peptone) und Amide. Die Entstehung der Albumosen, bzw. Peptone, und Amide aus den Eiweißkörpern der Gerste kann zurückgeführt werden auf die Einwirkung des lebenden Plasmas, oder auch auf die Einwirkung eines Enzyms welches allerdings durch die Thätigkeit des Plasmas gebildet werden muß. Letztere Annahme scheint zur Zeit in weiten Kreisen der Zymotechniker Geltung zu haben und man ist geneigt, einem der-

artigen Enzyme, der sogenannten Peptase, nicht nur eine Rolle bei den Stoffverwandlungen während der Keimung zuzuschreiben, sondern man nimmt an, daß dasselbe auch beim Maischprozesse mitwirke, wobei es einen lösenden und zersetzenden Einfluß auf die Eiweißkörper des Malzes ausüben soll. So schreibt, um nur ein Beispiel anzuführen, Harold Johnson¹⁾ »die Zunahme des Säuregrades während des Maischprozesses zum großen Teil der Peptase zu, indem dieselbe aus den Eiweißstoffen Körper bildet, die einen ausgesprochenen saueren Charakter haben, und welche unter den Namen: Säure-Peptide, Amidosäuren und Amide bekannt sind. Aus dem Asparagin wird wahrscheinlich durch die hydrolytische Thätigkeit der Peptase Asparaginsäure gebildet. So wie die Diastase und Cytase bei der Keimung thätig sind, so wird wohl auch die Peptase hierbei analog die Eiweißstoffe abbauen. Ein forcirtes Malz hat einen erhöhten Gehalt an löslichen stickstoffhaltigen Substanzen, was eben von der Peptase bewirkt wird.« — Die experimentellen That- sachen bieten allerdings solchen Annahmen durchaus keine genügende Stütze und erscheint die Existenz dieser »Peptase« jedenfalls sehr fraglich.

Es schien nun also geboten, die Frage nach der Existenz einer Peptase von neuem zu prüfen, um womöglich zu einem bestimmten Urtheile zu gelangen. Einerseits sollten die älteren Angaben über das Enzym kritisch untersucht, andererseits auch eigene diesbezügliche Versuche angestellt werden. Mit dieser Aufgabe beschäftigt sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit. Im zweiten Teil der-

¹⁾ Wochenschrift für Brauerei 1896, S. 1362.

selben wird dann unter Zugrundelegung der im ersten Teil gemachten Erfahrungen der Versuch gemacht, die löslichen, stickstoffhaltigen Bestandteile in Malz, Würze und Bier nach bestimmten Gruppen zu trennen.

I. Teil.

Über das Vorkommen eines peptonisierenden Enzyms im Malze.

Die Annahme eines peptonisierenden Enzyms im Malze ist zurückzuführen auf Versuche von Gorup-Besanez¹⁾, welcher aus Hanf- und Wicken-samen, sowie aus Darmmalz solche Enzyme isolierte. Er fällte zu diesem Zwecke aus diesem Samen bereitete Glycerinauszüge mit Alkohol-Äther; das erhaltene Präcipitat wurde durch wiederholtes Auflösen in Glycerin und Ausfällen mit Alkohol-Ather gereinigt; es hatte die Fähigkeit, ein mit 0,002% Salzsäure aufgequollenes Fibrin aufzulösen. Die Biuretreaktion trat sehr scharf ein. Auch in Flachs-samen und gekeimter Gerste fand sich dieses Enzym vor, nicht aber im Luftmalz.

Die v. Gorupschen Versuche wurden von C. Krauch²⁾ wiederholt. Krauch fand weder in Darmmalz noch in Wickensamen peptonisierende Fermente vor. Jener von Gorup erhaltene weißse Niederschlag gab auch für sich eine rote Biuretreaktion, und zwar ebenso stark, wie das Filtrat des mit dem Fermente behandelten Fibrins. Fibrin-

¹⁾ Berl. Ber. Bd. 7, S. 1478. — Bd. 8. S. 1510.

²⁾ Landw. Vers.-Stat. 1882. Bd. 27, S. 383. — 1879. Bd. 23, S. 78.

flocken mit der Fermentlösung zusammengebracht, ballten sich zwar sichtlich zusammen, doch wurde dasselbe Verhalten bei Anwendung von Glycerinauszügen beobachtet, die keine peptonisierenden Eigenschaften zeigten, z. B. von Rofskastanientrieben.

Die v. Gorupschen Angaben über das peptonisierende Malzenzym sind also von Krauch widerlegt worden. Die Ergebnisse Krauchs gelangten jedoch nicht zur Anerkennung. Nach wie vor hielt man an der Peptase fest.

Peptase.

Zum Studium der Peptase wurden dreierlei Versuchsreihen angestellt, und zwar:

- I. Versuche über das Verhalten von Malz zu Blutfibrin.
- II. Versuche, die eiweißlösende Kraft dieses peptonisierenden Enzyms aus der Zunahme der löslichen stickstoffhaltigen Bestandteile im Malze bei verschiedenen Extraktionsbedingungen und Temperaturen zu ermitteln.
- III. Versuche über die Einwirkung eines bekannten, eiweißlösenden Enzyms, des Pepsins, auf die Proteinstoffe des Malzes.

Von einer Wiederholung der Gorupschen Versuche konnte füglich abgesehen werden, da durch die sorgfältige Untersuchung von Krauch die Aussichtslosigkeit derselben hinlänglich erwiesen ist. Nach Krauchs Versuchen kann es keinem Zweifel unterliegen, daß man mit Glycerin dem Malz kein peptonisierendes Enzym entziehen kann. Auch haben eigene Versuche gelehrt, daß die Lintnersche Diastase, die ja bekanntlich durch Ausfällen von wässerigen Grünmalzauszügen mit Alkohol dar-

gestellt wird, kein peptonisierendes Enzym enthalte. Gequollenes Fibrin wurde von dieser Diastase selbst nicht spurenweise angegriffen, wogegen wenige Milligramm Pepsin es momentan vollständig auflösten. — Es eignen sich also auch wässrige Auszüge nicht, um dies Enzym zu isolieren. Es wurde daher ein anderer Weg betreten.

Schon Wurtz und Bouchut¹⁾ machten gelegentlich einer Untersuchung des Papayotins — eines eminent peptonisierenden Fermentes pflanzlichen Ursprungs, aus *Carica Papaya* gewonnen — die Beobachtung, daß Fibrin die Eigenschaft besitze, das Ferment den Lösungen zu entziehen und es so fest auf seiner Oberfläche zu fixieren, daß es durch Wasser nicht entfernt werden könne. Diese Beobachtung benutzte nun R. Neumeister²⁾ zum Nachweis des peptonisierenden Enzyms in 19—20 cm langen Gerstepflänzchen, die mit Sand zu einem feinen Brei zerrieben wurden.

Versuch 1. Es wurden nun seine Versuche zunächst mit 6—9 cm langen, bereits grünenden Gerstekeimlingen wiederholt. 400 g dieser Pflanzen wurden mit Sand in einem Mörser zu einem feinen Brei zerrieben, durch ein leinenes Tuch abgепrefst. In dem trüben Saft wurden ausgewaschene Fibrinflocken durch einen mälsig starken Luftstrom fünf Stunden lang in wirbelnder Bewegung erhalten. Die oberflächlich mit Wasser abgespülten Fibrinflocken wurden nun in Oxalsäurelösung (8 g cryst. im Liter) bei 40° C. im Thermostaten sechs Stunden lang digeriert. Zur Kontrolle wurde Fibrin direkt in

¹⁾ C. r. 1881. Bd. 93, S. 1104.

²⁾ Zeitschr. f. Biolog. 1894, S. 447.

Oxalsäurelösung gebracht und gleichfalls bei 40° C. sechs Stunden lang im Thermostaten digeriert. Man filtrierte hierauf ab, gab je zwei Tropfen verdünnte Kupfersulfatlösung hinzu und übersättigte mit Kalilauge. In beiden Filtraten trat eine gleich starke blaue Färbung von gelöstem Fibrin herrührend ein; eine enzymatische Einwirkung, die sich durch rote Biuretreaktion kennzeichnen müßte, war also nicht wahrzunehmen.

Versuch 2. Derselbe Versuch wurde mit Luftmalz ausgeführt, es war dies selbstgeschwelktes Malz (Grünmalz). Es wurden 400 g von diesem Luftmalz geschrotet und mit 1 l Wasser vermengt. Die Fibrinflocken wurden nun direkt in das Gemisch gebracht und dann das Ganze fünf Stunden am Rührwerk belassen. Hierauf wurde das Fibrin herausgenommen, abgespült und wie oben mit Oxalsäure digeriert. Erst nach sechs Stunden wurde das Fibrin merklich angegriffen, was sich in einer Lockerung des Gefüges kundgab, eine nennenswerte Auflösung hatte nicht stattgefunden. Indes gab das Filtrat eine ausgesprochene rote Biuretreaktion, die im Vergleich zum Kontrollversuch recht deutlich und scharf hervortrat.

Versuch 3. Auch in einem dunklen Darrmalz wurde auf eben dieselbe Weise eine enzymatische Einwirkung gefunden, die selbst eine schärfere, rote Biuretreaktion gab, als beim Luftmalz. In keinem Falle trat aber selbst bei sechsständigem Stehen bei 40° C. eine Auflösung des Fibrins ein, die momentan nach Zugabe von 0,010 g Pepsin erfolgte. Auf diese Weise schien also die Existenz eines peptonisierenden Enzyms im Malze bewiesen.

Versuch 4. Nach Grützners¹⁾ Angaben wurde nun Fibrin mit Carmin rot gefärbt, gut vom überschüssigen Farbstoff ausgewaschen und mit 10 g Malz bei 40° C. zwei Stunden digeriert. Das Filtrat blieb farblos, das Filtrum zeigte jedoch einen leichten Stich ins Rötliche. Es wurde daher derselbe Versuch quantitativ durchgeführt, indem 10 g Malz mit einem gut ausgewaschenen Fibrinflocken zwei Stunden bei 40° C. digeriert wurden.

Versuch 5.

Das Filtrat ergab in 50 ccm:

Mit Fibrin	a) 25,23 mg N	} 25,23
	b) 25,23 » »	
Kontrollversuch ohne Fibrin	a) 24,53 » »	} 24,53
	b) 24,53 » »	

Das Fibrin ist also von jenem Malzenzym so gut wie gar nicht angegriffen worden, und Fibrin wird ja von allen peptonisierenden Fermenten, geradezu wie Stärkekleister von der Diastase, zumal bei 40° C.²⁾ gelöst.

Es wurden nun mehrere Versuchsreihen ausgeführt, um darüber Aufschluss zu erhalten, ob die minimale Einwirkung, welche sich mit Fibrin konstatieren liefs, auch gegenüber den Eiweifssubstanzen

¹⁾ Arch. f. Physiol. Bd. 8, S. 452.

²⁾ Entgegen den bisherigen Anschauungen wurde gefunden, dafs das Fermentativvermögen einiger peptonisierenden Enzyme bei Temperaturen noch nicht aufgehoben wird, die weit über 40° C. liegen. So löst Pepsin in 0,002% Salzsäurelösung gequollenes Fibrin bis 65° C. momentan auf, ohne dabei zu Grunde zu gehen, da es noch die Fähigkeit besitzt, weitere Fibrinflocken zu verdauen. Ebenso verhält sich Inluvein, ein aus Hühnerkröpfen dargestelltes, peptonisierendes Enzym.

des Malzes in die Erscheinung trat. Dieselbe müßte sich jedenfalls durch eine erhebliche Zunahme der löslichen und unkoagulierbaren stickstoffhaltigen Substanzen zeigen, die bei der Extraktion beim Temperatur-Optimum der Peptase eintreten würde.

Es müßten nämlich koagulierbare Proteine von der Peptase zu löslichen unkoagulierbaren Peptonen und Albumosen umgewandelt werden. Es wurden also Malzauszüge bei verschiedener Temperatur angestellt und die Mengen der löslichen stickstoffhaltigen Substanzen in denselben bestimmt.

Um weiter die enzymatischen Einwirkungen zu verfolgen, wurde die Phosphorwolframsäure benutzt, welche bekanntlich Eiweißstoffe, Albumosen und Peptone ausfällt.

Der Stickstoff wurde durchweg nach der Kjeldahl'schen Methode bestimmt. Zum Titrieren benutzte man teils $\frac{N}{4}$ Natron-, teils $\frac{N}{4}$ Barytlauge. Als Indikator diente Methylorange. Alle Versuche wurden doppelt ausgeführt.

Bei den Phosphorwolframsäurefällungen wurden schwedische, quantitative Filter angewandt von 9 cm Durchmesser, da dieselben einen ziemlich konstanten Stickstoffgehalt von 0,0004 g zeigten. Die Phosphorwolframsäure wurde stets in der Form einer gesättigten Lösung angewandt. Die zu fällende Flüssigkeit wurde mit H_2SO_4 angesäuert, der Niederschlag mit H_2SO_4 -haltigem Wasser zweimal ausgewaschen.

Die Versuche wurden nun folgendermaßen ausgeführt: Je 10 g von feingemahlenem Malzmehl (helles Darrmalz) wurden in 100 ccm Mefskolben genau abgewogen und mit 75 ccm Wasser unter

häufigem Umschütten bei verschiedenen Extraktionsbedingungen und Temperaturen digeriert, wonach auf die Marke gefüllt und durch ein entsprechend großes, trockenes Faltenfilter klar abfiltriert wurde. Das angewandte Malz (helles Darrmalz) hatte einen Stickstoffgehalt von 1,25% in der Trockensubstanz.

Es wurde bei gewöhnlicher Temperatur nach der oben angegebenen Weise 1, 2, 3, 4, 5, 6 Stunden lang digeriert.

Versuch 6.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

Bei 1std. Extraktion Gesamt N =				a) 20,10 mg	} 20,25
				b) 20,40 »	
» 2 »	»	»	N =	a) 21,14 »	} 21,14
				b) 21,14 »	
» 3 »	»	»	N =	a) 21,14 »	} 21,31
				b) 21,49 »	
» 4 »	»	»	N =	a) 21,14 »	} 21,14
				b) 21,14 »	
» 5 »	»	»	N =	a) 21,49 »	} 21,49
				b) 21,49 »	
» 6 »	»	»	N =	a) 21,14 »	} 21,31
				b) 21,49 »	

Zur Kontrolle wurden auch 5 g Malz mit 75 ccm Wasser in einem 100 ccm Mefskolben vermengt, 4 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur digeriert, wonach auf die Marke gefüllt und klar abfiltriert wurde.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

Bei 4stünd. Extraktion Gesamt N = 10,51 mg.

Phosphorwolframsäurefällung.

Kalter Auszug bei 2stündiger Extraktion:

a) PWO N =	11,25 mg	} 11,25
b) » » =	11,25 »	

Man kann also annehmen, daß eine 2 stündige Extraktion genügt, und daß bei längerem Extrahieren bei gewöhnlicher Temperatur von den stickstoffhaltigen Bestandteilen des Malzes nichts mehr in Lösung geht. Im Mittel wurden erhalten 21,28 mg N in 50 ccm Malzauszug.

Versuch 7.

A. Es wurden 10 g Malzmehl mit 75 ccm Wasser in einem Mefskolben von 100 ccm gemengt und 2 Stunden bei 40° C. digeriert. Hierauf wurde abgekühlt, aufgefüllt auf die Marke und klar abfiltriert.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

$$\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 24,60 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 24,95 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gesamt N} \\ \text{Gesamt N} \end{array}} \right\} 24,77$$

Die Phosphorwolframsäurefällungen:

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

$$\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 13,00 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 13,35 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{PWo N} \\ \text{PWo N} \end{array}} \right\} 13,17$$

B. Es wurde ein Auszug wie oben bei 40° C. gemacht, vor dem Auffüllen jedoch wurde kurz aufgeköcht, dann abgekühlt, aufgefüllt auf die Marke und klar abfiltriert.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

$$\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 22,50 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 22,50 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{Gesamt N} \\ \text{Gesamt N} \end{array}} \right\} 22,50$$

Die Phosphorwolframsäurefällung:

$$\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 7,73 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 7,38 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{PWo N} \\ \text{PWo N} \end{array}} \right\} 7,55$$

Es ergab sich also bei diesem Versuch unter A, daß durch Digerieren bei 40° C. sowohl mehr Gesamt-Stickstoff, nämlich + 3,49 mg, als auch mehr Phosphorwolframsäure-Stickstoff + 1,2 mg, in Lösung gegangen sind als bei gewöhnlicher Temperatur. Es fragt sich nun, ob dieser Zuwachs auf

eine enzymatische Einwirkung oder einfach auf die mit der mäßigen Temperaturerhöhung verbundenen günstigeren Lösungsbedingungen zurückzuführen ist. Hierauf gibt nun Versuch B Aufschluß. Durch das Aufkochen vor der Filtration wurde der Gesamtstickstoff erniedrigt, durch Abscheidung der koagulierbaren Eiweißkörper und die Menge der Amide erhöht. Bedeutend erniedrigt wurde der Phosphorwolframsäure-Stickstoff, während man doch bei einer enzymatischen Einwirkung zweifellos eine Erhöhung desselben durch Bildung von Albumosen und Peptone hätte erwarten sollen. Die Annahme, daß die Spaltung der Proteinstoffe bereits bis zur Bildung von Amiden fortgeschritten sei, ist ganz unzulässig. Ein derartiger Vorgang würde die Anwesenheit eines Enzyms voraussetzen, das noch weit energischer auf die Eiweißkörper des Malzes einwirkt als Pepsin. Die Erniedrigung des Phosphorwolframsäure-Stickstoffs ist also jedenfalls auf die Abscheidung koagulierbarer Eiweißstoffe, der Zuwachs an Amiden auf die durch das Kochen in erhöhtem Maße eingetretene Lösung derselben zurückzuführen.

Versuch 8.

A. Es wurde aus 10 g Malz eine Würze bereitet, d. h. man vermengte 10 g feines Malzmehls mit 75 ccm Wasser von 45° C., digerierte bei dieser Temperatur eine halbe Stunde und erreichte hiernach 70° C. in 25 Minuten. Bei dieser Temperatur verblieb man nun, bis ein herausgenommener Tropfen, auf einem Porzellanteller mit Jodjodkaliumlösung zusammengebracht, weder blaue noch rote Reaktion gab. Hierauf wurde abgekühlt, aufgefüllt bis auf die Marke und klar abfiltriert.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

$$\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 26,00 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 25,30 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 26,00 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 25,30 \text{ »} & \end{array}} \right\} 25,65$$

Die Phosphorwolframsäurefällung:

$$\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 9,84 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 9,84 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 9,84 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 9,84 \text{ »} & \end{array}} \right\} 9,84$$

B. Es wurde auf die oben angegebene Weise aus 10 g Malz eine Würze bereitet und dieselbe mit den Trebern eine Stunde bei 70° C. digeriert.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

$$\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 26,00 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 25,65 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 26,00 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 25,65 \text{ »} & \end{array}} \right\} 26,32$$

Die Phosphorwolframsäurefällung:

$$\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 9,14 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 9,49 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 9,14 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 9,49 \text{ »} & \end{array}} \right\} 9,31$$

C. Es wurde auf eben dieselbe Weise eine Würze bereitet und dieselbe vor dem Auffüllen eine Stunde am Rückflusskühler mit den Trebern gekocht.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

$$\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 27,76 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 27,41 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 27,76 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 27,41 \text{ »} & \end{array}} \right\} 27,58$$

Die Phosphorwolframsäurefällung:

$$\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 9,14 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 8,79 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 9,14 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 8,79 \text{ »} & \end{array}} \right\} 8,96$$

D. Es wurde auf eben dieselbe Weise eine Würze bereitet und dieselbe vor dem Auffüllen 2 Stunden am Rückflusskühler mit den Trebern gekocht.

Je 50 ccm des klaren Filtrates ergaben:

$$\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 27,41 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 27,41 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{Gesamt N} = & \text{a) } 27,41 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 27,41 \text{ »} & \end{array}} \right\} 27,41$$

Die Phosphorwolframsäurefällung:

$$\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 8,43 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 9,14 \text{ »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{rcl} \text{PWo N} = & \text{a) } 8,43 \text{ mg} & \\ & \text{b) } 9,14 \text{ »} & \end{array}} \right\} 8,78$$

Aus diesen Zahlen sieht man, daß der Gesamt-Stickstoff in der Würze — zumal in der gekochten — erheblich zugenommen hat. Dieser Zuwachs besteht aber nur zum geringsten Teil aus durch Phosphorwolframsäure fällbaren Albumosen und Peptonen, wie die diesbezüglichen Fällungen zeigen. Vielmehr sind es Amide, die bei der vollkommeneren Auflösung ins Filtrat übergangen.

Der Übersichtlichkeit halber werden die erhaltenen Resultate, auf 100 g Malz berechnet, noch einmal zusammengestellt.

Auf 100 g Malztrockensubstanz berechnet, die 1,25 g N enthält.

Gesamt-Stickstoff im Malz: 1,250 g.

I. Versuch. Extraktion bei gewöhnlicher Temperatur:

- | | |
|------------------------------------|---------|
| a) 1 Stunde | 0,375 g |
| b) 2, 3, 4, 5, 6 Stunden | 0,402 » |

II. Versuch. Extraktion bei 40° C.:

- | | |
|---|---------|
| a) 2 Stunden | 0,460 » |
| b) 2 Stunden (vor dem Auffüllen aufgekocht und abfiltriert) | 0,421 » |

III. Versuch.

- | | |
|--|---------|
| a) Würze | 0,486 » |
| b) » (1 Stunde bei 70° C. digeriert) | 0,486 » |
| c) » (1 Stunde gekocht) | 0,519 » |
| d) » (2 Stunden ») | 0,512 » |

Die Phosphorwolframsäure fällt auf 100 g Malz berechnet:

I. Versuch Extraktion bei gewöhnlicher Temperatur:

- | | |
|---------------------|---------|
| 2 Stunden | 0,211 g |
|---------------------|---------|

II. Versuch. Extraktion bei 40° C.:

a) 2 Stunden	0,243 »
b) 2 Stunden (vor dem Auffüllen aufgekocht und abfiltriert)	0,145 »

III. Versuch.

a) Würze	0,184 g
b) » (1 Stunde bei 70° C. digeriert)	0,171
c) » (1 » » 100° C. »)	0,168 »

Man sieht also vom kalten Malzauszug bis zur gekochten Würze eine Zunahme des löslichen Gesamtstickstoffs. Diese Zunahme kann aber nicht auf Rechnung einer enzymatischen Einwirkung gesetzt werden, denn mit einer solchen müßte unbedingt eine Zunahme der löslichen nicht koagulierbaren Proteinstoffe, welche durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, Hand in Hand gehen. Dies ist aber nicht der Fall; die Menge der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe wird vielmehr verringert. Wie bereits erwähnt, geht es nicht an, diese Abnahme auf einen weiteren Abbau der löslichen Eiweißstoffe zurückzuführen. Wäre dies der Fall, so hätte man es mit einem außerordentlich kräftig wirkenden Enzyme zu thun, welches das Pepsin und Trypsin weit hinter sich ließe. Zum mindesten müßte man erwarten, daß sich unter den löslichen Proteinstoffen als Zwischenprodukte der Spaltung auch wahre Peptone vorfinden und mittels der Biuretreaktion leicht und sicher nachzuweisen wären. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie schon durch alte Versuche nachgewiesen ist und durch folgende von neuem gezeigt wird.

Versuch 9. Ein heller Malzauszug, eine helle Würze und ein helles Bier wurden a) mit Kupferoxydhydrat von der Hauptmasse der Proteine befreit,

b) mit Zinksulfat — nach vorhergehender Koagulation bei $1\frac{1}{2}$ Atm. Druck — die Albumosen ausgesalzen. In beiden Fällen bekam man eine krystallhelle, kaum gelblich gefärbte Flüssigkeit. (Bei Kupferoxydhydratfällung erst nach Zusatz von 2—3 Tropfen verdünnter Schwefelsäure.) Diese Flüssigkeit gab weder bei Malzauszügen, noch Würzen, noch Bier, mit verdünnter Kupfersulfatlösung und Übersättigung mit Kalilauge auch nur eine Spur von roter Biuretreaktion. Vielmehr trat eine rein bläuliche Färbung ein, die am wahrscheinlichsten von Kohlenhydraten und von Amiden herrührte, welche der Fällung entgangen waren. (Bei zinksulfathaltigen Flüssigkeiten beeinträchtigt das sich bildende Zinkhydroxyd nicht im geringsten die Biuretreaktion, eine Erfahrung, die bei Fleischpeptonen häufig gemacht wurde.)

Versuch 10. Es wurde auch ein Versuch Szymanskis¹⁾ wiederholt, da nach dessen Angaben im Malz »sehr geringe« Mengen von Peptonen sich vorfinden sollen. 200 g Malz wurden mit 1 l Wasser zwei Stunden lang am Rührwerk belassen, hierauf wurde klar abfiltriert. Der so erhaltene Auszug wurde durch Aufkochen von den meisten koagulierbaren Eiweißkörpern befreit. Man engte auf dem Wasserbade ein, neutralisierte mit Natronlauge und säuerte mit Essigsäure an. Hierauf wurde mit Kochsalz gesättigt und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde sodann mit Barythydrat bei gelindem Erhitzen auf dem Wasserbade zerlegt. Der Überschufs von Barythydrat wurde mit Schwefelsäure entfernt und die Lösung mit Bleioxydhydrat in der Kälte behandelt. Der Bleiüber-

¹⁾ Wagner 1885. S. 826.

schufs wurde mit Schwefelsäure genommen und die Lösung dialysiert. Das Diffusat wurde eingeeengt und in 96 % Alkohol gegossen. Der hierbei erhaltene weißse Niederschlag zeigte entgegen den Behauptungen Szymanskis nur eine schwach blaue Biuretreaktion, er erwies sich also als peptonfrei und der Hauptmenge nach aus anorganischen Salzen bestehend. Auch auf diesem Wege konnte also die Existenz der Peptone nicht nachgewiesen werden.

Es bilden sich demgemäß weder bei der Keimung, noch beim Maischen und kalten Extrahierungen Peptone. Ein peptonisierendes Malzenzym ist nicht vorhanden. Die rote Biuretreaktion, die bei den Fibrinversuchen beobachtet wurde, ist lediglich auf die schon von Poehl¹⁾ entdeckte Thatsache zurückzuführen, daß »Eiweißkörper in Berührung mit pflanzlichen und tierischen Geweben peptonisiert werden«. Das Fibrin ist durch den sechsständigen Kontakt mit dem Malz oberflächlich peptonisiert worden, es gab also die von demselben ablaufende Flüssigkeit eine rote Biuretreaktion.

Es war nun interessant, zu beobachten, ob die Proteinstoffe des Malzes der Einwirkung eines bekannten peptonisierenden Enzyms zugänglich sind, und wie sich bei einer derartigen Einwirkung die Zunahme des gesamten Stickstoffs und des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Anteils stellt.

Zur Ausführung des Versuchs diente ein Pepsin 1 : 2000 von E. Merck in Darmstadt.

Versuch 11.

10 g Malz mit 0,1 g Pepsin wurden 2 Stunden bei 40° C. digeriert und kurz aufgeköcht. Zur Kon-

¹⁾ Berl. Ber. 1881. S. 1335a.

trolle wurde ein analoger Versuch ohne Pepsin angesetzt und erst kurz vor dem Aufkochen genau 0,1 g Pepsin zugegeben. HCl wurde nicht zugegeben.

Man bekam in 50 ccm des Filtrates:

Mit Pepsin digeriert Gesamt N =	a) 41,63 mg N	}	41,80
	b) 41,98 » »		
Kontrollversuch	a) 29,83 » »	}	30,18
	b) 30,53 » »		

Phosphorwolframsäure fällte:

Mit Pepsin digeriert Gesamt N =	a) 14,57 » »	}	14,57
	b) 14,57 » »		
Kontrollversuch	a) 9,73 » »	}	9,55
	b) 9,38 » »		

Man sieht aus diesen Zahlen, wie kräftig das Pepsin eingewirkt hatte, und daß die Phosphorwolframsäure bei der annähernden Verfolgung enzymatischer Einwirkung immerhin gute Dienste leisten kann.

Aus den vorliegenden Untersuchungen lassen sich also folgende Schlüsse ziehen:

1. Im Malz ist kein peptonisierendes Enzym enthalten.
2. Dementsprechend gibt es im Malz, Würze und Bier keine Peptone.
3. Die Löslichkeit der stickstoffhaltigen Körper im Malz ist von den Extraktionsbedingungen abhängig.

II. Teil.

Versuche zur Trennung der stickstoffhaltigen Bestandteile in Malz, Würze und Bier.

Die stickstoffhaltigen Verbindungen des Malzes haben seit langer Zeit die Aufmerksamkeit der Forscher auf sich gelenkt. Nach und nach wurden dieselben zweckmäfsig in Gruppen eingeteilt, die zwar lediglich empirische Merkmale aufwiesen, dessen ungeachtet aber eine gewisse Charakterisierung und Trennung der einzelnen Körperklassen ermöglichten.

Man fand, dafs viele Metallsalze, ausserdem einige Säuren, wie die Phosphorwolframsäure, Gerbsäure u. a., Verbindungen mit jenen Substanzen eingehen und sie mehr oder weniger vollständig auszufällen vermögen. Man wandte sie also als diesbezügliche Reagenzien an, und so entstanden zahlreiche Methoden zur quantitativen Trennung und Bestimmung der stickstoffhaltigen Körper in Malz, Würze und Bier, welche man einteilte in Eiweiskörper, Peptone und Amide.

Die Eiweiskörper fällten Schulze und Barbieri¹⁾ mit Kupferoxydhydrat, Bungener und Fries²⁾ mit Bleihydroxyd und Bleiacetat, Ullik³⁾ mit Bleihydroxyd und Bleizucker, Hilger und van der Becke⁴⁾ mit Kupferoxydhydrat. Die Peptone, unter denen man auch die Albumosen verstand, wurden mit Phosphorwolframsäure von Schulze und Barbieri und Hilger und van der Becke, mit Gerbsäure von Bungener und Fries und Ullik gefällt.

¹⁾ J. f. Agr. Chem. 1881. S. 285.

²⁾ Zeitschr. f. ges. Brauwesen. 1884. S. 69.

³⁾ Zeitschr. f. ges. Brauwesen. 1887. S. 45.

⁴⁾ Arch. f. Hyg. 1890. S. 477.

Der Amid-Stickstoff wurde gewöhnlich aus der Differenz der Summe der vorherigen Gruppen (Eiweiß und Pepton) mit dem Gesamtstickstoff ermittelt. Teilweise wurden sie auch von Schulze und Barbieri, und auch Ullik mit Phosphorwolframsäure, und mit essigsaurem Quecksilberoxyd von Bungener und Fries gefällt. Hie und da bestimmte man die Amidosäuren durch Einwirkenlassen von salpetriger Säure und freier Stickstoffbestimmung. Die Ammonsalze wurden nur von Hilger und van der Becke durch Destillation mit Magnesiumoxyd (nach Schlösing) bestimmt.

Eine eigenartige und neue Methode hat H. Schjerning¹⁾ ausgearbeitet, indem er von der Beobachtung ausging, daß Zinnchlorür, Bleiacetat, Ferriacetat und Uranacetat bei parallelen Fällungen in der Würze steigende Stickstoffmengen in den Niederschlägen geben. Er nahm also an, daß 1. Zinnchlorür—Albumine, 2. Bleiacetat—Albumin + Denuclein, 3. Ferriacetat—Albumin + Denuclein + Propepton, 4. Uranacetat—Albumin + Denuclein + Pepton + Propepton ausfällt, wobei vorausgesetzt wurde, daß das nächstfolgende Reagenz, auch mit den vom vorhergehenden gefällten Substanzen Verbindungen eingehe, eine Behauptung, welche nach unseren Beobachtungen kaum zutreffen dürfte. Am häufigsten bediente man sich zur Fällung der löslichen Eiweißstoffe der Phosphorwolframsäure. Wir sehen indessen, daß derselben fast von jedem Forscher ein anderes Fällungsvermögen zugeschrieben wird: Peptone, Ammoniak und Alkaloide soll sie nach Schulze und

¹⁾ Fresenius Ber. 1894. S. 236, 1895. S. 135. — Chemiker-Ztg. 1896. S. 180.

Barbieri, Amide nach Ullik, Peptone nach Hilger und van der Beeke ausfällen.

Bleiacetat, das ziemlich häufig zur Eiweißbestimmung herangezogen, und Gerbsäure, das beliebte Peptonreagenz, fällen nach Krüger¹⁾ auch Xanthinbasen aus, also teilweise die Amide. —

Wir sehen also, daß hier Meinungsunterschiede bestehen, die eine komparative Zusammenstellung der durch verschiedene Forscher erhaltenen Resultate unmöglich machen. Eine einheitliche Methode hier auszuarbeiten, die möglichst von den etwa durch spezielle Bedingungen beeinflussten Reagenzien unabhängig wäre, schien der Mühe wert zu sein. Die zwei üblichsten Fällungsmittel, das Kupferoxydhydrat und die Phosphorwolframsäure, wurden hierbei einer kritischen Untersuchung unterzogen, auch mußte die bisherige Klassifizierung der Eiweißkörper im folgenden, was die Peptone anbetrifft, modifiziert werden. —

Peptone sind Spaltungsprodukte der Eiweißkörper, welche mit alkalischer Kupferlösung die Biuretreaktion (rote Färbung) geben; sie kommen in Malz, Würze und Bier nicht oder wenigstens nicht in nachweisbarer Menge vor.

Die löslichen, unkoagulierbaren Stoffe, welche man als Peptone angesprochen, gehören zur Klasse der Albumosen.

Es würden sich demgemäß die stickstoffhaltigen Verbindungen in jenen Materialien folgenderweise²⁾ gruppieren lassen:

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chem. 1894. S. 351. S. 423.

²⁾ Ähnliches siehe: Sykes Wochenschrift f. Brauerei. 1891. S. 721.

1. Koagulierbare Eiweißkörper, vorzugsweise Albumine.
2. Die Albumosen.
3. Die Amide.

1. Koagulierbare Eiweißkörper.

Die Albumine sind bei der gewöhnlichen Extraktionsmethode mit reinem Wasser alle als koagulierbar anzunehmen. —

Schon bei 40° C. trübt sich ein Malzauszug, und bis 70° C. sind bereits die meisten Albumine ausgeschieden. Durch Eindampfen und Wiederaufnehmen der Auszüge wird nur um wenig mehr koaguliert als durch bloßes Aufkochen, wie folgender Versuch beweist:

Versuch 1.

In einem Malzauszug bekam man

Gesamtstickstoff in 100 ccm	74,71 mg N	= 100
Durch Kochen ausgeschieden	13,76 » »	= 18,42 %
Durch Eindampfen	14,08 » »	= 18,85 %

Ein Teil der koagulierbaren Eiweißkörper wird unter Druck ausgeschieden. —

Es wurde dies durch einen Versuch gezeigt, bei welchem ein Auszug aufgeköcht wurde; die ausgeschiedenen Eiweißkörper wurden abfiltriert, das Filtrat unter 1½ Atm. Druck 1 Stunde behandelt. Es schieden sich noch namhafte Mengen koagulierter Eiweißkörper aus. Ein ähnlicher Versuch wurde quantitativ ausgeführt. Ein Malzauszug wurde aufgeköcht, die ausgeschiedenen Eiweißkörper wurden abfiltriert und der Stickstoff in denselben bestimmt. Ein anderer Teil dieses Auszugs wurde eine Stunde unter 1½ Atm. Druck im Dampftopf behandelt.

Versuch 2.

Man bekam in 50 cem des Malzauszugs:

Gesamtstickstoff 39,04 mg N = 100

1. Durch Kochen ausgeschieden 6,57 » » = 16,82 %

2. 1 Std. unter $1\frac{1}{2}$ Atm. Druck 8,76 » » = 22,43 %

Das Filtrat bei 2 wurde nochmals 1 Stunde bei $1\frac{1}{2}$ Atm. behandelt, es blieb klar; es genügt also das einstündige Erhitzen bei $1\frac{1}{2}$ Atm. Druck, um alle koagulierbaren Eiweißkörper auszuschcheiden.

Da die Albumine beim Kochen ihrer wässerigen Lösung quantitativ ausgefällt (koaguliert) werden, so läßt die Thatsache, daß in Malzauszügen, Würze und Bier erst bei $111,7^{\circ}$ C. Eiweißkörper ausgeschieden werden, darauf schließen, daß entweder die Koagulation durch die übrigen in Lösung befindlichen Stoffe (Salze, Kohlehydrate) beeinflusst, oder schwer koagulierbare Proteinstoffe (ähnlich den Kaseïnen) vorhanden sind. Letztere Annahme erscheint als die wahrscheinlichere. Vermutlich werden durch die Phosphate des Malzes kleine Mengen Glutinkaseïn gelöst, welche erst bei $1\frac{1}{2}$ At. oder bei der Konzentration von Würze und Bier durch Eindampfen sich abscheiden.

Die Bestimmung der koagulierbaren Eiweißkörper.

Dieselbe ist sehr einfach: Man behandelt eine abpipettierte Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit 1 Stunde bei $1\frac{1}{2}$ Atm. Druck im Dampftopf. Man filtriert noch heiß und wäscht mit heißem Wasser aus. Hiernach bestimmt man den Stickstoff im erhaltenen Niederschlag. Man bekommt genaue und bei parallelen Versuchen übereinstimmende Resultate (s. u.).

Verhalten gegen Kupferoxydhydrat und Phosphorwolframsäure.

Es werden diese Körper auch von der Phosphorwolframsäure und Kupferoxydhydrat vollkommen gefällt. Die Filtrate jener Fällungen geben beim Behandeln unter Druck keine Ausscheidung mehr.

2. Die Albumosen.

Als weitere den Albuminen am nächsten stehende Klasse kommen die Albumosen in Betracht. Diese Körper sind durch Ammonsulfat aus ihren sauren Lösungen aussalzbar. Baumann und Böhmer¹⁾ haben gezeigt, daß Ammonsulfat durch Zinksulfat hierbei gänzlich ersetzt werden könne, ein Umstand, der die Anwendung der Kjeldahlschen Methode bei der Bestimmung des Albumosenstickstoffes ermöglicht. Man bestimmt also die Albumosen, indem man die von koagulierbaren Eiweißkörpern (unter Druck) befreite und zweckmäfsig eingeeengte Flüssigkeit mit einigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure ansäuert und nun feingepulvertes Zinksulfat so lange unter fleifsigem Umrühren zusetzt, bis etwas vom Salze ungelöst bleibt. Man läfst dann über Nacht bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Bleibt noch am andern Tage Salz auf dem Boden ungelöst, so war genug zugegeben. Es scheiden sich hierbei die Albumosen als bräunliche, auf der Oberfläche schwimmende Flocken aus, die zuweilen eine homogene Decke bilden. Man filtriert nun über ein trockenes Filter und wäscht mit gesättigter und angesäuerter Zinksulfatlösung zweimal aus. Hierauf

¹⁾ Zeitschr. für Unt. der Nähr- und Genußmittel. 1898. Februarheft.

wird das Filter mit dem Niederschlag nach Kjeldahl verbrannt, und zwar ohne zu trocknen, da er sonst leicht an den Trichter anbackt. Die Resultate sind sehr genau (s. u.).

Verhalten der Albumosen gegen Kupferoxydhydrat.

Auch die Albumosen scheinen durch Kupferoxydhydrat, wenn auch nicht vollständig, gefällt zu werden, ein Umstand, auf den schon Ullik¹⁾ hinwies, indem er sagte, das Kupferoxydhydrat sei ein unzuverlässiges Reagenz, da es »Peptone« niederreisse. Unter »Peptonen« sind hier wohl die Albumosen zu verstehen — wie ja bei der Malzanalyse stets nur »Peptone« bestimmt wurden. Dafs nun Albumosen gefällt werden, zeigt folgender mit einem Fleischpepton ausgeführter Versuch. Dieses Fleischpepton bestand vorwiegend aus Albumosen und war frei von koagulierbaren Eiweiskörpern.

Versuch 3 (Fleischpepton).

Gesamtstickstoff	= 100
Kupferoxydhydratstickstoff . . .	= 59 %

Dafs sie aber nicht vollständig gefällt werden, ergibt sich aus der Thatsache, dafs im Filtrate von Kupferoxydhydratniederschlag Zinksulfat noch bedeutende Mengen ausfällt.

Versuch 4.

Es fällte in 50 cem eines kalten Auszugs Kupferoxydhydrat:

Gesamtstickstoff	= 49,30 mg N
Kupferoxydhydratstickstoff . . .	= 26,04 » »

¹⁾ Zeitschrift f. ges. Brauwesen. 1887. S. 45.

Im Filtrate von Kupferoxydhydrat-

Zinksulfat N	= 5,00 mg N
(Zinksulfatstickstoff direkt)	= 9,80 » »)
(Koaguliert unter Druck)	= 14,79 » »)

Auch in Würze und Bier fällt Kupferoxydhydrat größere Mengen stickstoffhaltiger Substanzen, als den koagulierbaren Eiweißkörpern entspricht.

Versuch 5 (Würze).

In 50 cem Würze fällte Kupferoxydhydrat:

Gesamtstickstoff	31,24 mg N = 100
Kupferoxydhydrat-Stickstoff	11,92 » » = 38,39%
(Koagulierbar. Eiweißkörper N)	3,17 » » = 10,16%

Versuch 6 (Bier).

Gesamtstickstoff	a) 65,54 mg N b) 65,54 mg N
Kupferoxydhydrat N	a) 23,49 » » b) 22,74 » »
[(Koagul. Eiweißkörper N a) 1,5 » » b) 1,5 » »)]	

Es geht aus diesen Zahlen hervor, daß auch hier dieses Reagenz Albumosen gefällt hat, aber wieder nicht vollständig, da mit Zinksulfat im Filtrat von Kupferoxydhydrat stets noch eine Fällung erhalten wurde.

Verhalten der Albumosen gegen Phosphorwolframsäure.

Die Phosphorwolframsäure fällt die Albumosen vollständiger als Kupferoxydhydrat. Daß diese Fällung nicht quantitativ vor sich geht, darauf haben schon Kühne und Chittenden hingewiesen, was auch von R. Neumeister bestätigt wurde. Nach R. Neumeister¹⁾ entgehen regelmäsig die Deuteroalbumosen

¹⁾ Zeitschrift f. Biolog. 1890. S. 309.

der Fällung. Es stimmen diese Angaben mit den Beobachtungen Sebeliens ¹⁾ überein, wonach Albumosen und Peptone bis auf einen einzigen Fall von diesem Reagenz nie vollständig ausgefällt wurden. Man konnte immer Stickstoff in Filtraten nachweisen, deren ursprüngliche Substanz lediglich aus Albumosen und Peptonen bestand. Diesbezügliche Versuche bestätigten diese Thatsachen. So wurde ein Oberteig aus einer Brauerei, der nach gründlichem Auswaschen einen Brei aus fast reinem koaguliertem Eiweiß darstellte, mit Pepsin und Salzsäure (2 pro mille HCl) teilweise verdaut. Im klaren Filtrate fällt die Phosphorwolframsäure:

Versuch 7.

Gesamtstickstoff	= 100
Phosphorwolframsäurestickstoff .	= 93 %.

In dem schon erwähnten, käuflichen Fleischpepton fällt die Phosphorwolframsäure:

Versuch 8.

Gesamtstickstoff	= 100
Phosphorwolframsäurestickstoff .	= 94,74 %.

In beiden Fällen zeigten die Filtrate eine blaue Biuretreaktion, es waren also Spuren von Albumosen der Fällung entgangen. Da nun das Zinksulfat die Albumosen vollkommen auszufällen vermag, so wurde dessen Fällungsvermögen mit dem der Phosphorwolframsäure verglichen. Man fällte zu diesem Zwecke in einem Teil eines dunklen Bieres direkt mit Phosphorwolframsäure und in einem anderen Teil mit Zinksulfat. Im Filtrate von Zinksulfat wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt.

¹⁾ Zeitschrift f. physiol. Chem. 1889.

Man bekam in 100 ccm Bier:

Versuch 9.

Gesamtstickstoff		= 65,20 mg N
1. Phosphorwolframsäurestickstoff		= 25,91 » »
2. Zinksulfatstickstoff		= 11,68 » »
3. Phosphorwolframsäurestickstoff im		
Filtrate von Zinksulfat		= 12,04 » »

Man sieht, daß die durch Zinksulfat gefällten Substanzen (Albumosen) im Phosphorwolframsäure-niederschlag enthalten sind.

Es lag nun noch nahe, zu untersuchen, ob die Kupferoxydhydrat- und Phosphorwolframsäure-fällungen in ihrer Genauigkeit durch einen Dextrin-gehalt der Flüssigkeiten nicht beeinträchtigt werden. Zu diesem Zwecke wurde aus dem schon mehrmals erwähnten käuflichen Fleischpeptone eine Lösung bereitet, indem man 2,190 g desselben in 500 ccm Wasser löste und klar filtrierte. Dieses Verhältnis gleicht dem Stickstoffgehalt nach ungefähr einem Malzauszug von 1 Malz zu 7 Wasser. Ein Teil dieser Lösung wurde mit 8% (genau 7,9%) eines mit Oxal-säure hergestellten Dextrins versetzt. Man bekam in 25 ccm:

Versuch 10.

	Mit Dextrin:	Ohne Dextrin:
Gesamtstickstoff		
	a) 14,2 mg N	a) 14,2 mg N
	b) 14,2 » »	b) 14,2 » »
	} 14,2	} 14,2
Phosphorwolframsäure = N		
	a) 12,02 mg N	a) 12,65 mg N
	b) 12,37 » »	b) 12,65 » »
	} 12,19	} 12,65
Kupferoxydhydrat = N		
	a) 6,92 mg N	a) 8,37 mg N
	b) 6,57 » »	b) 8,20 » »
	} 6,74	} 8,28

Man sieht also, daß die Phosphorwolframsäurefällung durch den Dextrinzusatz kaum merklich, indes die Kupferoxydhydratfällung beträchtlich beeinflusst wurde.

Das Kupferoxydhydrat ist also bei Würze und Bier zu verwerfen.

3. Amide.

Es machen die Albumine mit den Albumosen in Auszügen nur die Hälfte — in Würze und Bier selbst weniger als die Hälfte des Gesamtstickstoffs aus. Den Rest bilden die Amide.

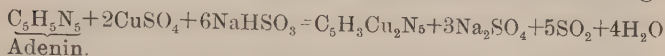
Nach Ullik¹⁾ finden sich unter den Amididen in Malzauszügen, Würze und Bier wahrscheinlich Leucin und Tyrosin vor. Asparagin und Glutaminsäure konnten nicht nachgewiesen werden. Dagegen ist mit voller Sicherheit der Beweis für die Existenz des Hypoxanthins, Guanins und Vernins in Auszügen, Würze und Bier geliefert worden, also Verbindungen, die zu der physiologisch so wichtigen Klasse der Alloxurkörper gehören.

Eine quantitative Bestimmung dieser Körper wurde bislang nicht versucht. Krüger²⁾ hatte nun eine ursprünglich von Drechsler und Balke angegebene Bestimmungsmethode der Xanthinbasen modifiziert auf Harn übertragen. Er versetzte 100 cem Harn mit 10 cem 13 proz. Kupfersulfatlösung und 10 cem gesättigter Natriumbisulfatlösung in der Siedehitze und gab dann 5 cem 10proz. Baryumchloridlösung hinzu. Hierauf wird abfiltriert und der Niederschlag 5mal auf dem Filter mit heißem Wasser ausgewaschen. Im Niederschlag wird nach dem Austrocknen der

¹⁾ S. o.

²⁾ Du Bois Reymond. Arch. 1894. S. 553.

Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Der Prozess verläuft nach Krüger im Sinne folgender Gleichung:



Krüger fällt in saurer, neutraler wie alkalischer Lösung. Die Baryumchloridfällung hat jedenfalls nur den Zweck, das Abfiltrieren des oft fein verteilten Niederschlags zu erleichtern. »Mit Hilfe von Kupfersulfat und Natriumbisulfit« — sagt Krüger¹⁾ — »werden alle Xanthinkörper, die noch eine substituierbare Imidgruppe enthalten, namentlich aus heißer Lösung als Kupferoxydulverbindungen gefällt. Eine bemerkenswerte Ausnahme macht das Theobromin. Insoweit die Fällbarkeit durch das genannte Reagens quantitativ verfolgt wurde, hat sie sich als gleichwertig mit ammoniakalischer Silberlösung erwiesen«. Dieses Verfahren wurde nun auch bei Malzauszug, Würze und Bier angewendet, wobei man die Beziehungen dieser Fällungen zur Phosphorwolframsäure, Zinksulfat und Kupferoxydhydrat klarstellte. — Zunächst wurde ein Versuch gemacht, eine größere Menge der Xanthinbasen in Malz nachzuweisen. Hierbei bediente man sich der oben erwähnten Krügerschen Methode. Es wurde also ein Malzauszug aus 300 gr und 1 l Wasser bei gewöhnlicher Temperatur bereitet. Durch Aufkochen wurde derselbe von dem größten Teil der koagulierbaren Eiweißkörper befreit, wonach man ihn auf dem Wasserbade auf etwa 150 ccm einengte. Hierauf wurde mit 10 ccm 13proz. Kupfersulfat und 10 ccm Natriumbisulfit in der Hitze gefällt. Es schied sich ein schmutzig-weißer Niederschlag aus, die Flüssigkeit färbte sich milchig-grün,

¹⁾ Zeitschr. f. phys. Chem. 1894. S. 423.

welche Farbe aber bald ins Braune übergang. Der Niederschlag wurde abfiltriert. Er bräunte sich an der Luft — ein Teil, in einer Dampfschale mit Salpetersäure eingedampft, gab einen gelben Fleck, der, mit Kalilauge befeuchtet, eine purpurrote Murexidreaktion zeigte, die zumal beim Erwärmen wunderschön hervortrat. Man hatte es hier also ganz bestimmt mit Xanthinbasen zu thun. Der Hauptteil wurde vom Filter genommen und mit Natriumsulfit in wässriger Lösung 3 Stunden digeriert, hierauf Salzsäure zugesetzt, wobei sich fast der ganze Niederschlag zu einer gelbbraunen Flüssigkeit auflöste. Im klaren Filtrate wurde mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Der Niederschlag war graulich-weiß, flockig und sehr voluminös. Es wurde nun auf dem Filter mit kaltem Wasser ausgewaschen, dem man etwas ammoniakalische Silberlösung zusetzte. Hierauf löste man ihn vom Filter und behandelte in der Wärme mit Salpetersäure von spec. Gew. 1:1. Es löste sich darin der Niederschlag bis auf einen kleinen Rest auf. Das Filtrat wurde eingedampft, man bekam hierbei einige Centigramme einer schön hellgelben Substanz, die, mit Kalilauge befeuchtet und erwärmt, eine prächtige purpurrote Murexidreaktion gab. Es war also kein Zweifel darüber vorhanden, daß man es hier mit den Xanthinbasen zu thun hatte.

Es war nun von Interesse, zu ermitteln, wie sich dieses Reagens gegen die anderen Gruppen von stickstoffhaltigen Substanzen verhielt. —

Um Klarheit hierüber zu erlangen, wurden folgende Versuche ausgeführt:

Es wurde: 1. das Verhältniß des Xanthinreagens zu den koagulierbaren Eiweißkörpern, 2. zu

den Albumosen festgestellt. Schließlich wurde das Verhalten des Kupferoxydhydrats und der Phosphorwolframsäure zu dem Xanthinreagens und auch zu der ganzen Gruppe der Amide ermittelt.

Die Versuchsreihen gaben folgende Resultate:

Versuch 11.

Um das Verhältnis des Xanthinreagens zu den koagulierbaren Eiweißkörpern zu ermitteln, wurde ein Malzauszug bei A. durch Aufkochen, bei B. durch 1 Stunde bei $1\frac{1}{2}$ Atm. Druck koaguliert. Die Albumosen wurden mittels Zinksulfats und in dem Filtrat die Xanthinkörper bestimmt.

Man bekam in 100 ccm:

A. (Durch Aufkochen.)

B. (Unter Druck.)

Albuminstickstoff

= a) 23,25 mg N	} 23,42	a) 28,89 mg N	} 28,89
b) 23,60 » »		b) 28,89 » »	

(Albumosenstickstoff

= a) 21,14 mg N	} 21,49	a) 21,14 mg N	} 21,29)
b) 21,84 » »		b) 21,44 » »	

Xanthinstickstoff

= a) 6,35 mg N	} 6,05	a) 3,17 mg N	} 3,17
b) 5,75 » »		b) 3,17 » »	

Es werden also jene unter Druck koagulierbaren Eiweißkörper von dem Xanthinreagens mitgerissen.

Versuch 12.

Um das Verhältnis des Xanthinreagens zu den Albumosen festzustellen, wurde direkt mit den Xanthinreagenzien im Malzauszug gefällt.

Man bekam in 50 ccm: a) 45,16 mg N } 44,98.
b) 44,81 » » }

Versuch 13.

Es wurde ein von koagulierten Eiweißkörpern durch Aufkochen befreiter Auszug mit Schwefelsäure angesäuert und mit Zinksulfat ausgesalzen. Im Filtrat bestimmte man die Xanthinbasen.

Man bekam in 50 ccm:

Zinksulfatstickstoff (Albumosen)

$$\begin{array}{rcl} & = \text{a) } 40,78 \text{ mg N} & \\ & \text{b) } 40,78 \text{ » »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{a) } 40,78 \text{ mg N} \\ \text{b) } 40,78 \text{ » »} \end{array}} \right\} 40,78$$

Xanthinreagenzstickstoff (im

$$\begin{array}{rcl} \text{Filtrat der Albumosen) .} & = \text{a) } 18,20 \text{ mg N} & \\ & \text{b) } 18,90 \text{ » »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{a) } 18,20 \text{ mg N} \\ \text{b) } 18,90 \text{ » »} \end{array}} \right\} 18,55$$

Aus den Ergebnissen der Versuche 12 und 13 sieht man, daß ein großer Teil der Albumosen vom Xanthinreagens mitgerissen wird.

Nach den bisherigen Resultaten müssen also die koagulierbaren Eiweißkörper und die Albumosen vor der Xanthinkörperfällung aus der zu untersuchenden Flüssigkeit entfernt werden, da man sonst viel zu hohe Zahlen für den Alloxurkörperstickstoff bekommt.

Verhalten des Kupferoxydhydrats zu dem
Xanthinreagens.

Versuch 14.

Um dieses klarzustellen wurde mit dem Xanthinreagens zunächst direkt in einem Malzauszug gefällt.

$$\begin{array}{rcl} \text{Man bekam in 50 ccm:} & \text{a) } 26,22 \text{ mg N} & \\ & \text{b) } 25,52 \text{ » »} & \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{a) } 26,22 \text{ mg N} \\ \text{b) } 25,52 \text{ » »} \end{array}} \right\} 25,87.$$

Versuch 15.

Bei diesem Versuch wurde mit dem Xanthinreagens erst im Filtrat von Kupferoxydhydrat gefällt.

Man bekam in 50 cem:

Kupferoxydhydratstickstoff	= a) 24,04 mg N	} 24,21
	= b) 24,39 » »	
Xanthinreagenzstickstoff (im Filtrate von Kupferoxydhydrat)	= a) 11,66 mg N	} 12,01
	= b) 12,36 » »	

Man sieht aus diesen Zahlen, daß das Xanthinreagens einen Teil der durch Kupferoxydhydrat fällbaren Substanzen niederschlägt. Daß nun dieser Teil aus Albumosen besteht, ersieht man aus dem Vergleich der Fällungen mit Kupferoxydhydrat und Zinksulfat mit den durch das Xanthinreagens in den diesbezüglichen Filtraten erhaltenen Werten.

Versuch 16a.

Die direkte Fällung im Auszug mit dem Xanthinreagens:

Xanthinreagenzstickstoff . . . = 45,49 mg N = 100.

Versuch 16b.

Nach Ausfällung mit Zinksulfat fällt im Filtrat noch das Xanthinreagens:

• Xanthinreagenzstickstoff . . = 18,20 mg N = 40 %.

Versuch 17a.

Die direkte Fällung im Auszug mit dem Xanthinreagens:

Xanthinreagenzstickstoff . . . = 25,87 mg N = 100.

Versuch 17b.

Nach Ausfällung mit Kupferoxydhydrat fällt im Filtrat das Xanthinreagens:

Xanthinreagenzstickstoff . . = 12,00 mg N = 46,4 %.

In diesen beiden Versuchen ist der durch das Xanthinreagens erhaltene Stickstoff fast um dieselbe

Zahl vermindert worden. Es ist also der hierbei von Kupferoxydhydrat gefällte Anteil mit jenem durch Zinksulfat aussalzbaren identisch, es sind Albumosen.

Verhalten des Xanthinreagens zur Phosphorwolframsäure.

Die Phosphorwolframsäure fällt die Xanthinbasen vollständig, eine Thatsache, die schon von Schulze und Barbieri¹⁾ vermutet wurde.

Es wird dies durch folgenden Versuch bestätigt.

Versuch 18.

Ein Malzauszug wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, im Filtrat bestimmte man die Xanthinbasen.

Man bekam in 50 cem:

Phosphorwolframsäurestickstoff	a) 90,35 mg N	} 90,17
	b) 90,00 » »	
Xanthinreagenzstickstoff (im Filtrat von Phosphorwolframsäure)	a) 0,00 mg N	
	b) 0,00 » »	

Verhalten des Kupferoxydhydrats zu den Amidn.

Es ist bis jetzt festgestellt worden, dafs das Kupferoxydhydrat die koagulierbaren Eiweiskörper quantitativ, die Albumosen aber nur teilweise ausfällt. Die durch Kupferoxydhydrat in Auszügen, Würze und Bier erhaltenen Zahlen sind aber gröfser als die Summe der koagulierbaren Eiweiskörper und selbst aller Albumosen. Es fällt also das Kupferoxydhydrat auch Amide aus.

¹⁾ J. f. Agr. Chem. 1881, S. 285.

Man sieht dies aus folgenden Versuchen:

Versuch 19.

Kalter Auszug in 50 ccm:

Gesamtstickstoff	= 49,3 mg N
Kupferoxydhydratstickstoff	= 26,04 » »
Zinksulfatstickstoff	= 9,80 » »
Koagulierbarer Eiweißkörperstickstoff	= 14,79 » »
(Zinksulfatstickstoff [im Filtrat von Kupferoxydhydrat])	= 5,00 » »)

Versuch 20.

Würze in 50 ccm:

Gesamtstickstoff	= 31,24 mg N
Kupferoxydhydratstickstoff	= 11,92 » »
Zinksulfatstickstoff	= 6,12 » »
Koagulierbarer Eiweißkörperstickstoff	= 3,17 » »

Versuch 21.

Bier in 100 ccm:

Gesamtstickstoff	= 65,54 mg N
Kupferoxydhydratstickstoff	= 23,49 » »
Zinksulfatstickstoff	= 15,70 » »
Koagulierbarer Eiweißkörperstickstoff	= 1,50 » »

Es wird also jene von Schultze ausgesprochene Vermutung, daß das Kupferoxydhydrat auch Amide auszufällen vermag, vollkommen bestätigt, eine Tatsache, die bei der großen Beliebtheit, dessen sich das besagte Reagens zumal bei der Futtermittelanalyse erfreut, von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist. Es werden nämlich die mit Kupferoxydhydrat in jenen Materialien erzielten Stickstoffwerte mit 6,25 multipliziert und als »Reineiweiß« in Rechnung gezogen.

Verhalten der Phosphorwolframsäure zu den Amiden.

Wir haben bis jetzt gesehen, daß die Phosphorwolframsäure die koagulierbaren Eiweißkörper und die Xanthinkörper vollständig ausfällt.

Auch die Albumosen werden mit einer Genauigkeit niedergeschlagen, wie sie eben bei organischen Verbindungen als praktisch genügend angesehen werden muß. Die Summe der genannten drei Gruppen ist jedoch kleiner als die durch direkte Fällung mit Phosphorwolframsäure erhaltenen Stickstoffwerte.

Am prägnantesten tritt dies bei der Bieranalyse hervor, wie folgender Versuch zeigt.

Versuch 22.

In 100 ccm Bier:	A.	B.
Gesamtstickstoff . . .	= 65,20 mg N	65,20 mg N
Phosphorwolframsäure		
= N	= 25,91 » »	25,16 » »
Zinksulfatstickstoff . .	= 11,68 » »	11,68 » »
Xanthinstickstoff . .	= 3,00 » »	2,65 » »
Koagulierbarer Eiweiß-		
körper = N . . .	= 1,40 » »	1,40 » »

Ähnliches sehen wir auch in der Würze, wenn auch hier die Differenzen nicht so groß sind.

Versuch 23.

In 100 ccm Würze:	A.	B.
Gesamtstickstoff . . .	= 52,48 mg N	52,48 mg N
Phosphorwolframsäure		
= N	= 19,88 » »	19,53 » »
Zinksulfatstickstoff . .	= 10,48 » »	10,13 » »

	A.	B.
Xanthinstickstoff . . .	= 4,76 mg N	4,01 mg N
Koagulierbarer Eiweiß-		
körper = N . . .	= 2,12 » »	1,79 » »

Wir müssen also daraus folgern, daß auch anderweitige Amide von der Phosphorwolframsäure gefällt werden, eine Meinung, die auch von Ullik (s. o.) vertreten ist.

Aus den bisherigen Resultaten können wir folgende Schlüsse ziehen:

1. Die koagulierbaren Eiweißkörper werden erst unter Druck (1 Stunde bei $1\frac{1}{2}$ Atm.) vollständig ausgeschieden.

2. Dieselben werden von der Phosphorwolframsäure und Kupferoxydhydrat vollständig gefällt.

3. Die durch Zinksulfat aussalzbaren, stickstoffhaltigen Verbindungen — die Albumosen — werden von der Phosphorwolframsäure so gut wie quantitativ ausgefällt. Kupferoxydhydrat fällt dieselben nur teilweise.

4. Kupferoxydhydrat fällt außer den koagulierbaren Eiweißkörpern und einem Teil der Albumosen auch Amide, da die mit diesem Reagens erhaltenen Zahlen die Summe der koagulierbaren Albumine und selbst aller Albumosen weit übersteigen.

5. Die Phosphorwolframsäure fällt außer den koagulierbaren Eiweißkörpern, Albumosen und den Xanthinbasen auch einen Teil der anderweitigen Amide.

6. Natriumbisulfid und Kupfersulfat fallen in Malzauszügen, Würze und Bier die Xanthinbasen aus, doch müssen zuvor alle koagulierbaren Albumine und alle Albumosen entfernt sein, da sonst dieselben

mitgerissen werden. Die Xanthinkörper werden von der Phosphorwolframsäure vollständig gefällt.

4. Quantitative Trennungsmethode.

Nachdem so genügend Aufschlüsse über die stickstoffhaltigen Körper in Malzauszug, Würze und Bier und ihre Beziehungen zu den üblichsten Reagenzien vorlagen, konnte man zur Ausarbeitung einer quantitativen Trennungsmethode dieser Körperklassen übergehen. Ein besonderes Gewicht wurde hierbei darauf gelegt, die diesbezüglichen Körpergruppen wirklich zu trennen; man arbeitete daher im Laufe der Analyse stets mit derselben Flüssigkeitsmenge, da man nur auf diese Weise sicher sein konnte, jede Körpergruppe für sich allein zu bestimmen. Verläßt man sich nämlich auf das Fällungsvermögen der Reagenzien und ihre Affinität zu den speziellen Klassen von stickstoffhaltigen Substanzen, indem man in aliquoten Mengen einer Flüssigkeit, ohne zu trennen, fällt, so bekommt man Stickstoffmengen, die einem Gemische der verschiedensten Verbindungen entsprechen, und demgemäß auch zu keinen vollständigen Schlüssen berechtigen können. Gleiche Stickstoffmengen, von zwei verschiedenen Reagenzien in demselben Substrat erhalten, entsprechen nur im seltensten Fall denselben Stickstoffverbindungen.

So sagt Schjerning¹⁾, daß durch Phosphorwolframsäure und Uranacetat in ebenderselben Weise die Eiweißkörper gefällt werden. Es trifft dieser Satz annähernd für Würze und Malzauszüge zu, während er bei der Untersuchung von einem Fleischpepton sich als unhaltbar erwies:

¹⁾ Wochenschrift f. Brau. 1898.

Versuch 24.

	a) im Auszug	b) in Würze	c) in Pepton
Gesamt N	= 100	= 100	= 100
Phosphorwolframsäure N	= 56,66	= 47,22	= 89
Uranacetat N	= 55,01	= 52,79	= 8,7.

Es ist also das Fällungsvermögen des Uranacetats von ganz speziellen Bedingungen abhängig, und es erstreckt sich dasselbe nicht auf alle von der Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen, zumal wie für das Fleischpepton nachgewiesen, nicht auf die Albumosen.

Vergleichen wir nun weiter das Fällungsvermögen des Kupferoxydhydrats mit Phosphorwolframsäure, so sehen wir auch hier erhebliche Differenzen, die sich nicht auf die Quantität, sondern lediglich auf die Qualität der gefällten stickstoffhaltigen Substanzen beziehen.

Es fällt in einem Auszug:

Versuch 25.

Gesamtstickstoff	= 100	
Phosphorwolframsäure N	= 48,88	} Differenz 1,37%
Kupferoxydhydrat N . . .	= 47,51	
Phosphorwolframsäure im Filtrat d. Kupferoxydhydrats	= 9,5%	

Wir sehen hier also, daß Phosphorwolframsäure quantitativ fast dieselben Stickstoffmengen wie Kupferoxydhydrat ausfällt, die aber qualitativ zum Teil verschiedenen stickstoffhaltigen Substanzen entsprechen. So wissen wir ja, daß Phosphorwolframsäure die Albumosen und Xanthinbasen praktisch quantitativ ausfällt, während Kupferoxydhydrat die ersteren teilweise, letztere gar nicht niederschlägt.

Auch ist der Anteil an den anderweitigen Amiden bei beiden Reagenzien verschieden.

Bei der Ausarbeitung der Trennungsmethode konnten also die Phosphorwolframsäure und das Kupferoxydhydrat keine Verwendung finden, da die durch diese Reagenzien erhaltenen Stickstoffmengen einem Gemisch aller drei Körpergruppen: Albumine, Albumosen und Amide entsprechen.

Es wurde nunmehr folgender Weg eingeschlagen: Da die Albumine bei Malzauszügen alle als koagulierbar aufzufassen sind, so wurden dieselben durch Koagulation und zwar unter Druck abgeschieden und bestimmt.

Die Albumosen zeichnen sich durch ihre Ausfällbarkeit gegenüber Ammonsulfat aus. Ammonsulfat kann hierbei vorteilhaft durch Zinksulfat ersetzt werden; es wurde also diese Körperklasse durch Ausfällen des Albuminfiltrats mit Zinksulfat bestimmt. Es blieben nun die Amide, deren Menge sich zuerst aus der Differenz des Gesamtstickstoffs und desjenigen der Albumine und Albumosen ergab. Da sich nun unter den Amiden die physiologisch hochwichtige Klasse der Xanthinbasen befand, so wurden dieselben im Filtrat von Zinksulfat mit Natriumbisulfit und Kupfersulfat bestimmt. Es gestaltete sich also der Gang der Analyse zunächst bei Malz folgendermaßen:

100 g feingemahlenes Malz, von bekanntem Stickstoff- und Wassergehalt, wurden in einem abtarierten Stutzen mit 500 g Wasser vermengt und 2 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur am Rührwerk belassen. Hierauf wurde auf das ursprüngliche Gewicht ergänzt, und durch ein entsprechend großes Faltenfilter filtriert. Vom klaren Filtrate nahm man

zwei Proben von je 25 ccm zur Gesamtstickstoffbestimmung, woraus man den gesamtlöslichen Stickstoff berechnet. Es wurden weiter in zwei 200 ccm Flaschen je 100 ccm Auszug abpipettiert und 1 Stunde bei $1\frac{1}{2}$ Atm. im Dampftopf gehalten. Diese beiden Portionen wurden noch heiß über Filter von bekanntem Stickstoffgehalt gegossen und mit heißem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat wurde direkt zweckmäßig in Abdampfschalen gesammelt. Im gut ausgewaschenen Coagulum wird der Stickstoff bestimmt. Das Filtrat wird auf dem Wasserbad bis auf etwa 20 ccm eingengt, mit 1—2 Tropfen Schwefelsäure angesäuert und nun unter fleißigem Umrühren mit so viel feingepulvertem Zinksulfat versetzt, bis etwas vom Salze auf dem Boden ungelöst bleibt. Man läßt nun einige Stunden stehen; es scheiden sich hierbei die Albumosen als braune, auf der Oberfläche schwimmende Flocken aus. Man gießt durch ein trockenes Filter und wäscht zweimal mit gesättigter Zinksulfatlösung aus, die man mit 1—2 Tropfen Schwefelsäure angesäuert hat. Das Filtrat erhitzt man zum Sieden und gibt nun 10 ccm gesättigte Natriumbisulfatlösung, 10 ccm 13 proz. Kupfersulfatlösung und schließlich 5 ccm 10 proz. Baryumchloridlösung hinzu. Der Xanthinniederschlag wird nach dem Absetzen und Erkalten abfiltriert, fünfmal auf dem Filter mit heißem Wasser ausgewaschen und der Stickstoff bestimmt, der als Xanthinkörperstickstoff in Rechnung gezogen wird. Die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff und dem koagulierbaren Stickstoff + Albumosenstickstoff + Xanthinstickstoff gibt den anderweitigen Amidstickstoff.

Bei Bier wurde genau wie mit dem schon fertigen Auszuge verfahren.

Die Würze wurde aus 100 g Malz und 500 ccm Wasser hergestellt nach der oben angegebenen Weise.

Mit dieser Methode erhielt man folgende Resultate:

Helles Darrmalz.

Kalter Auszug.

Auf 100 g lufttrockener Substanz $H_2O = 5,06\%$.

Gesamtstickstoff = 1,620.

	A.	B.
Gesamtlösl. N . .	= a) 0,503	a) 0,521
	b) 0,510	b) 0,514
Albumin N . . .	= a) 0,162	a) 0,169
	b) 0,165	b) 0,167
Albumosen N . .	= a) 0,106	a) 0,103
	b) 0,109	b) 0,108
Xanthin N . . .	= a) 0,018	a) 0,022
	b) 0,018	b) 0,024
Anderw. Amid N	= a) 0,217	a) 0,227
	b) 0,218	b) 0,215

Dunkles Darrmalz.

Kalter Auszug.

Auf 100 g lufttrockener Substanz $H_2O = 7,98\%$.

Gesamtstickstoff = 1,570.

	A.	B.
Gesamtlösl. N . .	= a) 0,524	a) 0,524
	b) 0,517	b) 0,524
Albumin N . . .	= a) 0,140	a) 0,141
	b) 0,144	b) 0,139
Albumosen N . .	= a) 0,105	a) 0,100
	b) 0,100	b) 0,097
Xanthin N . . .	= a) 0,015	a) 0,012
	b) 0,015	b) 0,011
Anderw. Amid N	= a) 0,264	a) 0,271
	b) 0,258	b) 0,277

Helles Darrmalz.

Würze.

Auf 100 g lufttrockener Substanz $H_2O = 5,06\%$.

Gesamtstickstoff = 1,620.

Gesamtlöslicher N . . .	= a) 0,613
	b) 0,620
Albumin N	= a) 0,063
	b) 0,060
Albumosen N	= a) 0,123
	b) 0,120
Xanthin N	= a) 0,035
	b) 0,032
Anderweitige Amid N . .	= a) 0,392
	b) 0,408

Dunkles Darrmalz.

Würze.

Auf 100 g lufttrockener Substanz $H_2O = 7,98\%$.

Gesamtstickstoff = 1,570.

Gesamtlöslicher N . . .	= a) 0,564
	b) 0,578
Albumin N	= a) 0,056
	b) 0,056
Albumosen N	= a) 0,113
	b) 0,106
Xanthin N	= a) 0,032
	b) 0,032
Anderweitige Amid N . .	= a) 0,363
	b) 0,384

Vergleichen wir nun die Analysenresultate eines Auszugs und einer Würze miteinander, so ist zuerst hervorzuheben, daß ein Unterschied zwischen dunklem und hellem Malz nicht wahrzunehmen ist. Es ist weiter der sehr grofse Zuwachs an löslichem

Stickstoff in der Würze fast ausschliesslich den Amiden zuzuschreiben; dieselben haben um das Doppelte zugenommen, ebenso die dort zugehörige Klasse der Xanthinbasen. Auch dieses Resultat weist wieder zwingend darauf hin, dafs von der Thätigkeit eines peptonisierenden Enzyms im Malz nicht die Rede sein kann, was ja auch im vorigen Kapitel vollständig bewiesen wurde.

Helles Bier.

Auf 1 l bezogen:

	A.	B.
Gesamtstickstoff	= a) 0,655 b) 0,655	a) 0,620 b) 0,620
Albuminstickstoff	= a) 0,015 b) 0,011	a) 0,014 b) 0,011
Albumosenstickstoff	= a) 0,157 b) 0,153	a) 0,145 b) 0,138
Xanthinstickstoff	= a) 0,032 b) 0,032	a) 0,032 b) 0,032
Anderw. Amidstickstoff . . .	= a) 0,451 b) 0,459	a) 0,429 b) 0,439

Dunkles Bier.

Auf 1 l bezogen:

	A.	B.
Gesamtstickstoff	= a) 0,888 b) 0,888	a) 0,831 b) 0,831
Albuminstickstoff	= a) 0,014 b) 0,014	a) 0,015 b) 0,015
Albumosenstickstoff	= a) 0,186 b) 0,179	a) 0,194 b) 0,201
Xanthinstickstoff	= a) 0,046 b) 0,046	a) 0,046 b) 0,053
Anderw. Amidstickstoff . . .	= a) 0,642 b) 0,649	a) 0,576 b) 0,562

Es wäre natürlich verfehlt, wollte man aus den vorliegenden Zahlen irgendwie allgemeinere Schlüsse ziehen.

Die Analysen sollten nur den Weg andeuten, auf welchem man vielleicht zu einem Beobachtungsmaterial gelangen könnte. Ein solches Beobachtungsmaterial wäre dann vielleicht geeignet, einen weiteren Einblick in die Veränderungen zu gewähren, welche die stickstoffhaltigen Bestandteile der Gerste bei der Malzbereitung erleiden. Besonderes Interesse dürfte wohl die Menge der koagulierbaren Eiweißkörper im Biere beanspruchen und etwa die Xanthinbasen.

Den koagulierbaren Eiweißkörpern gehören offenbar jene Substanzen an, welche bei der Aufbewahrung pasteurisierten Bieres in den Flaschen sich absetzen. Es wird daher sich ein Bier um so eher zum Pasteurisieren und längerer Aufbewahrung eignen, je weniger koagulierbare Eiweißkörper es enthält.

Was die Xanthinbasen betrifft, so sind dieselben von Interesse wegen ihrer physiologischen Eigenschaften, und es ist gewifs nicht ausgeschlossen, daß ein Teil der anregenden Wirkung des Bieres dieser Substanz zugeschrieben werden kann.

Nehmen wir nun an, daß durchschnittlich im Liter Bier sich 33 mg Xanthinstickstoff befindet, so entspricht dies 1 dg Substanz pro 1000 ccm. Vergleichen wir diese Zahlen mit der gewöhnlichen Alkaloidkonzentration im Theeaufguß, so finden wir, daß das Bier doppelt so viel jener Basen enthält als der gewöhnliche Thee. — Der Theeaufguß wird für gewöhnlich in Polen und zumal in Rußland, wo er von allen Volksklassen in großen Mengen getrunken wird, in einer Verdünnung zu sich ge-

nommen, die etwa 2 g Blätter pro 1 l Wasser entspricht. Die trockenen Theeblätter enthalten nun 1—4,5 % Thein; nehmen wir durchschnittlich 2,5 %, so haben wir erst 5 cg im Liter, wogegen das Bier 1 dg aufweist, also gerade das Doppelte.

Die Resultate vorliegender Arbeit lassen sich nun folgenderweise zusammenfassen:

1. Ein peptonisierendes Enzym (Peptase) ist im Malz nicht nachzuweisen; ebenso wenig finden sich nachweisbare Mengen von Peptonen in Malz, Würze und Bier.
2. Es sind die stickstoffhaltigen Verbindungen in Malzauszügen, Würze und Bier zwecks quantitativer Trennung und Bestimmung in koagulierbare Eiweißkörper, Albumosen und Amide eingeteilt worden, wobei man erstere durch Koagulation unter Druck, die Albumosen durch Aussalzen mit Zinksulfat, und aus den Amidien die Xanthinkörper durch Natriumbisulfit und Kupfersulfat (nach Krüger) ausfällt, und die hierbei erhaltenen Stickstoffzahlen (nach Kjeldahl) in Rechnung zieht. Der Rest des löslichen Gesamtstickstoffs entfällt auf die unbestimmbaren Amide.
3. Es wurde festgestellt, daß a) die Phosphorwolframsäure Albumine, Albumosen, Xanthinkörper so gut wie quantitativ ausfällt, neben einem Teile der »Anderweitigen Amide«; b) Kupferoxydhydrat fällt Albumine quantitativ, Albumosen und Amide nur teilweise. Ein mäßiger Dextringehalt der Flüssigkeit wirkt störend auf die Genauigkeit der erhaltenen

Zahlen. — Beide Reagenzien — Phosphorwolframsäure und Kupferoxydhydrat — sind demnach unzuverlässig, und geben die durch dieselben erhaltenen Stickstoffmengen gar keine Anhaltspunkte, da sie den verschiedensten Körperklassen angehören.

4. Das Verfahren von Krüger zur Bestimmung der Xanthinkörper in tierischen Flüssigkeiten erscheint auch geeignet zur Ermittlung jener Stoffe in Malzauszügen, Würze und Bier.



